

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局

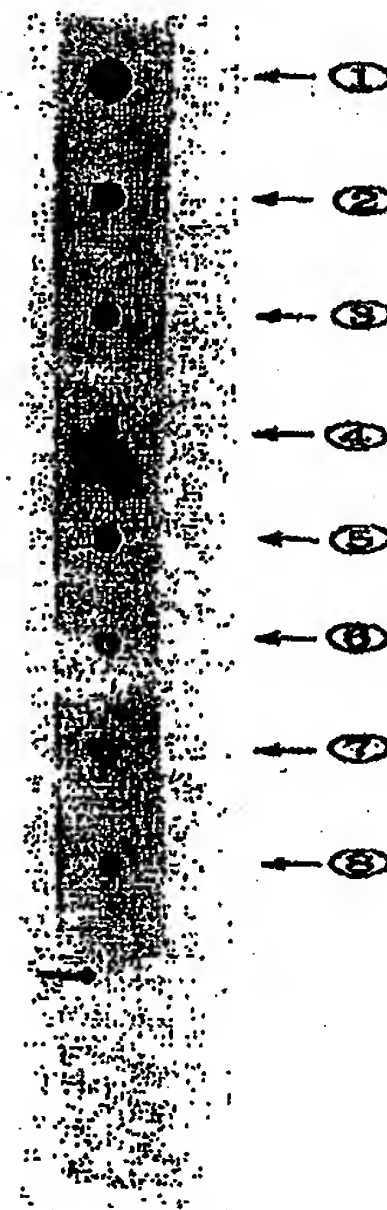


特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 C12Q 1/68, 1/28, 1/42	A1	(11) 国際公開番号 WO 95/04832
		(43) 国際公開日 1995年2月16日 (16.02.1995)
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP93/01124 (22) 国際出願日 1993年8月10日 (10. 08. 93)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 扶桑薬品工業株式会社 (FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP] 〒541 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 松久明生 (MATSUHISA, Akio) [JP/JP] 〒631 奈良県奈良市右京2-1-2-32-504 Nara, (JP) 芝 清隆 (SHIBA, Kiyotaka) [JP/JP] 〒170 東京都豊島区池袋本町4-28-5-301 Tokyo, (JP) 三河義一 (MIKAWA, Yoshikazu) [JP/US] 90122 カリフォルニア州 サンディエゴ、アパートメント 2222、 シャルマン・ドライブ、ロード 7405番 California, (US) 岸雄一郎 (KISHI, Yuichiro) [JP/JP] 〒640 和歌山県和歌山市吹屋町5-53-4 Wakayama, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 青山 稔, 外 (AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AT (欧州特許), AU, BE (欧州特許), CA, CH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), IE (欧州特許), IT (欧州特許), KR, LU (欧州特許), MC (欧州特許), NL (欧州特許), PT (欧州特許), SE (欧州特許), US.</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>

(54) Title : METHOD OF DETECTING NUCLEIC ACID

(54) 発明の名称 核酸の検出法



(57) Abstract

A method of detecting a nucleic acid which comprises bringing a solid carrier suspected to carry or contain a nucleic acid into contact with a polyamine containing, bound thereto, a label capable of generating a detectable signal or a precursor thereof to thereby form a complex between a nucleic acid, if any, and the polyamine, removing the polyamine which has not formed any complex before or after the conversion of the precursor, if used, into the label, and detecting the label.

(57) 要約

核酸を付着または含有している疑のある固形担体に、測定可能なシグナルを発生し得る標識またはその前駆体を結合させたポリアミンを接触させて、核酸とポリアミンとの間で複合体を形成させ、前駆体を用いた場合は標識に変換し、その前または後に複合体を形成していないポリアミンを除去し、その後、標識を検索することを特徴とする核酸の検出法。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	DE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
BB	バルバドス	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SD	スーダン
BE	ベルギー	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BF	ブルキナ・ファソ	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BG	ブルガリア	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BJ	ベナン	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BR	ブラジル	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	ML	マリ	TD	チャド
CA	カナダ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TG	トゴ
CF	中央アフリカ共和国	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TJ	タジキスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	JP	日本	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NL	オランダ	US	米国
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェッコ共和国	KR	大韓民国	NZ	ニュージーランド	VN	ヴェトナム
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	PL	ポーランド		

明 細 書

核酸の検出法

技術分野

この発明は、ポリアミンが核酸と静電的に結合する性質を利用した核酸の検出法に関するものである。

背景技術

核酸の検出法としては、従来、臭化エチジウムを用いる方法が広く行なわれている。この方法は、核酸に臭化エチジウムを複合(インターカレーション)させ、その際発せられる蛍光によって核酸の位置を知る方法である。しかし、この方法によるときは明所では蛍光を確認できないため、暗所で紫外線照射下に撮影した像を現物と対照して核酸の位置を知らねばならず、不便であった。また、臭化エチジウムは強い発がん性を有するので[例えば「遺伝子操作マニュアル」(講談社サイエンティフィック)第2頁第18-21行]、取扱いが危険であった。そのほかの方法として、アニオン性金コロイドを用いる方法およびカチオン性カコジル酸鉄コロイドを用いる方法[ジーン・アナリシス・テクニックス(Gene Anal. Techn.) 1986年、1-5頁]が知られている。しかし、これらは何れも感度が悪く、また金コロイドによる方法は背景染色であるから識別が容易でなく、さらに染色後のハイブリダイゼーションが影響を受けるという欠点があり、鉄コロイドによる方法はハイブリダイゼーション後の染色ができないという欠点があった。したがって、上記のような欠点のない、容易、安全、確実、簡便な核酸検出法の開発が望まれていた。

ポリアミンがDNAに結合し、またRNAにも親和性を有することは既に知られている[バイオケミカル・ジャーナル(Biochem. J.) 103巻, 811-815頁(1967)、ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Bo

il.) 24巻, 113-122頁(1967)、ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.) 42巻, 363-373頁(1969)、ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.) 121巻, 327-337頁(1978)等]。また、ポリアミンで修飾した蛋白質相補的ポリヌクレオチドと共有結合させてなるプローブを、標的ポリヌクレオチドの検出に用いることも公知である(特表昭60-501488号、その公告公報である特公平2-59720号およびその分割出願である特開平1-124400号)。しかし、標識したポリアミンを核酸に複合させることによる核酸検出法は知られていない。

発明の開示

この発明は、(1)核酸を付着または含有している疑のある固形担体に、測定可能なシグナルを発生し得る標識またはその前駆体を結合させたポリアミンを接触させて、核酸とポリアミンとの間で複合体を形成させ、前駆体を用いた場合は標識に変換し、その前または後に複合体を形成していないポリアミンを除去し、その後、標識を検索することを特徴とする、核酸の検出法、

(2)標的核酸を付着または含有している疑のある固形担体に、(イ)測定可能なシグナルを発生し得る標識またはその前駆体を結合させた標的核酸にハイブリダイズし得るプローブをハイブリダイゼーション条件下で接触させて、ハイブリッドを形成させ、前駆体を用いた場合は標識に変換し、その前または後にハイブリッドを形成していないプローブを除去し、その後、標識を検索することを含む第1の検出操作、および(ロ)測定可能なシグナルを発生し得る別の標識またはその前駆体を結合させたポリアミンを接触させて、核酸とポリアミンとの間で複合体を形成させ、前駆体を用いた場合は標識に変換し、その前または後に複合体を形成していないポリア

ミンを除去し、その後、標識を検索することを含む第2の検出操作、を組合わせて任意の順序で実施することを特徴とする、標的核酸とそれ以外の核酸の識別検出法および

(3)(イ)酵素で標識したポリアミン、および(ロ)酵素作用によりシグナルを発生する色原体を含む、核酸検出用キットを提供するものである。

この発明で使用する用語について説明すると次の通りである。

「核酸」は、プリンまたはピリミジン塩基、ペントースおよびりん酸が結合してなるヌクレオチドを基本単位とし、りん酸のエステル結合によって重合したポリマーである。塩基としては、アデニン、シトシン、グアニン、チミン、ウラシルおよびそれらの修飾塩基が含まれる。また、核酸には糖部分の違いによってDNAとRNAがあり、さらに1本鎖、2本鎖等および立体構造の違いがある。

「固形担体」は、核酸の分離または検出に用いられる薄板、シート、ストリップ、スラブ、フィルム、メンブラン等を包含する。代表的なものは、アガロースゲル、ナイロン膜、濾紙、ニトロセルロース膜等である。

「標識」は、測定可能なシグナルを発生する物質であり、酵素(基質との組合わせとして)、スピン化合物、放射性核種、蛍光物質、化学発光物質、吸光物質等が含まれる。好ましい標識は酵素である。酵素としては、ペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコース-6-りん酸脱水素酵素等が含まれる。酵素活性の測定法には、吸光度法、蛍光法および化学発光法がある。例えば、ペルオキシダーゼは色原体としては2,2'-アジノジ(3-エチルベンズチアゾリン)-6'-スルホン酸(ABTS)のような基質を用い、生じた色素を吸光度法で測定する。グルコースオキシダーゼはグルコースを基質として過酸化水素を生ずるので、ペルオキシダーゼと共役させて上と同

様に測定できる。 β -ガラクトシダーゼはo-ニトロフェニル- β -D-カラクトシドを基質として測定できる。蛍光法としては、例えばペルオキシダーゼはp-ヒドロキシフェニルプロピオン酸を基質として、 β -ガラクトシダーゼはフルオレスセイン- β -D-ガラクトシドまたは4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトシドを基質として、またホスファターゼはウンベリフェリルりん酸またはブロモクロロインドリルホスフェート/ニトロブルーテトラゾリウムを基質として測定できる。化学発光法としては、例えばペルオキシダーゼはルミノールと過酸化水素を基質として測定できる。標識(例えば酵素)をポリアミンに結合させるには、例えばベンゾキノン(キンヒドロ)、ビス[2-(スクシンイミドカルボニルオキシ)エチル]スルホン(BSOCOES)、ビス(スルホスクシンイミジル)スベラート(BS3)、1,2-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン(DFDNB)、4,4'-ジイソチオシアノー-2,2'-ジスルホスチルベン、ジナトリウム塩(CDIDS)、アジピンイミド酸ジメチル・ジ塩酸塩、N-(γ -マレイミドブチリルオキシ)スクシンイミド(GMBS)、N-(4-アジドフェニルチオ)フタルイミド(APTP)、N-スクシンイミジルー6-(4'-アジドフェニル)-1,3'-ジチオプロピオナート(SADP)、ピリジンジスルフィド、チオフタルイミド等の架橋試薬を用いる。

「標識前駆体」は、例えば阻害物質でブロックされた標識のように、標識に転換され得る物質である。

「シグナル」は、可視光、蛍光、放射能、その他の電磁波等である。測定値をそれを発生した物質の量と関連づけることができるものが好ましい。

「標識の探索」は、上記のようなシグナルを肉体的または機械的手段で検出することを含む。

「ポリアミン」は、第1級アミノ基を2個以上有する脂肪族骨格の化合物

であり、天然(生体)アミンおよび合成ポリマーが含まれる。通常炭素原子数3～50、好ましくは6～15または20程度の脂肪族鎖の両端に第1級アミノ基があり、鎖がイミノ基で中断されることがあり得る。代表的な天然ポリアミンは、1,3-ジアミノプロパン、プトレッツシン、カダベリン、ノルスペルミジン、スペルミジン、ホモスペルミジン、アミノプロピルカダベリン、テルミン、スペルミン、テルモスペルミン、カナバルミン、アミノペンチルノルスペルミジン、N,N'-ビス(アミノプロピル)カダベリン、カルドペンタミン、ホモカルドペンタミン、カルドヘキサミン等である。代表的な合成ポリアミンには、ジエチレントリアミン、トリエチレンテトラミン、テトラエチレンペンタミン、ペンタエチレンヘキサミン、ヘキサメチレンジアミン、ポリエチレンイミン(平均分子量約10,000-約200,000、好ましくは約20,000-約100,000、例えば約50,000-約60,000のもの、例えばBASF社のポリミンG35)等が含まれる。

「複合」または「複合体」は、静電的および／または物理的結合または結合物を意味し、共有結合または結合物を意味しない。通常、複合は可逆的であり、容易に解離させることができる。

「ハイブリダイズ」または「ハイブリダイゼーション」とは、2本の1本鎖ポリヌクレオチドが相補的またはほぼ(例えば70%以上、好ましくは80または85%以上、特に90または95%以上)相補的である場合に、結合して2本鎖を形成することをいう。

「ハイブリダイゼーション条件下」とは、ハイブリダイズし得るポリヌクレオチドがハイブリッドを形成する条件をいう。一般に、この条件は、温度として約70℃以下、好ましくは約60℃以下、通常、約40-55℃を含む。時間は短時間で充分である。

「標的」は、関心の対象であることを表わす。

「プローブ」は、標的DNAまたはその一部分と相補性が高いDNAであり、通常、標的DNAより短く、約5-50塩基、好ましくは約10-40塩基、例えば約20-30塩基からなる。

図面の簡単な説明

図1は実施例1におけるλDNAの検出結果を示す図である。

図2は実施例1におけるエシエリキア・コリ(E. coli)rRNAの検出結果を示す図である。

図3は実施例1におけるλHind III DNAの電気泳動の写真である。

図4は実施例1において、pBR322に挿入されたDNA断片を制限酵素で消化したもの（本発明による発色）の電気泳動の写真である。

図5は実施例1において、pBR322に挿入されたDNA断片を制限酵素で消化したもの（X線像）の電気泳動の写真である。

図6は実施例1におけるλHind III DNAの電気泳動の写真である。

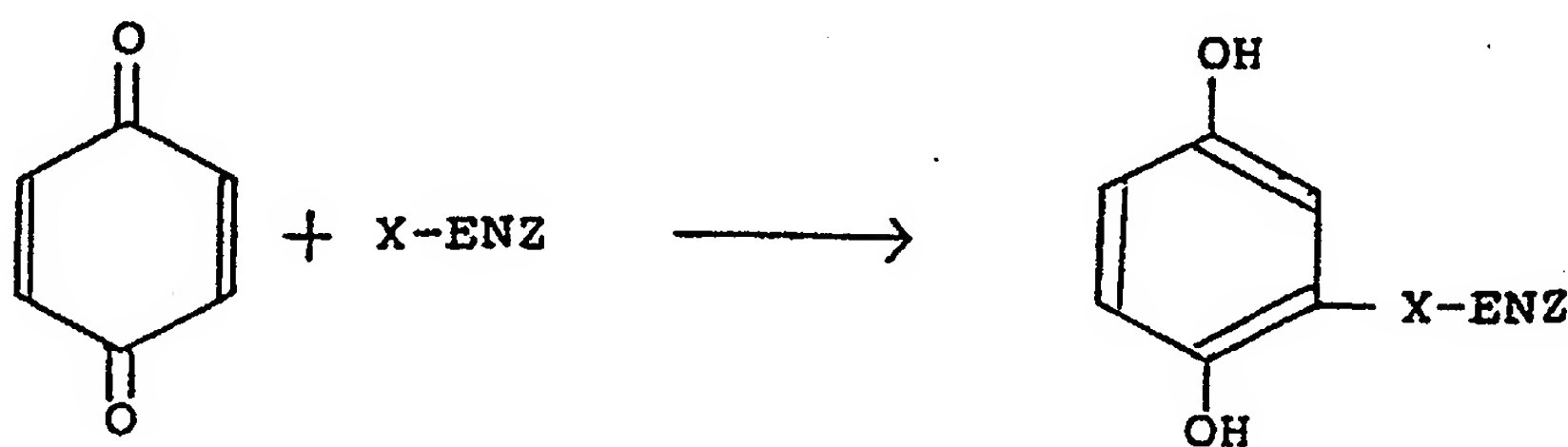
図7は実施例1における図6と同じλHind III DNAの電気泳動の写真である。

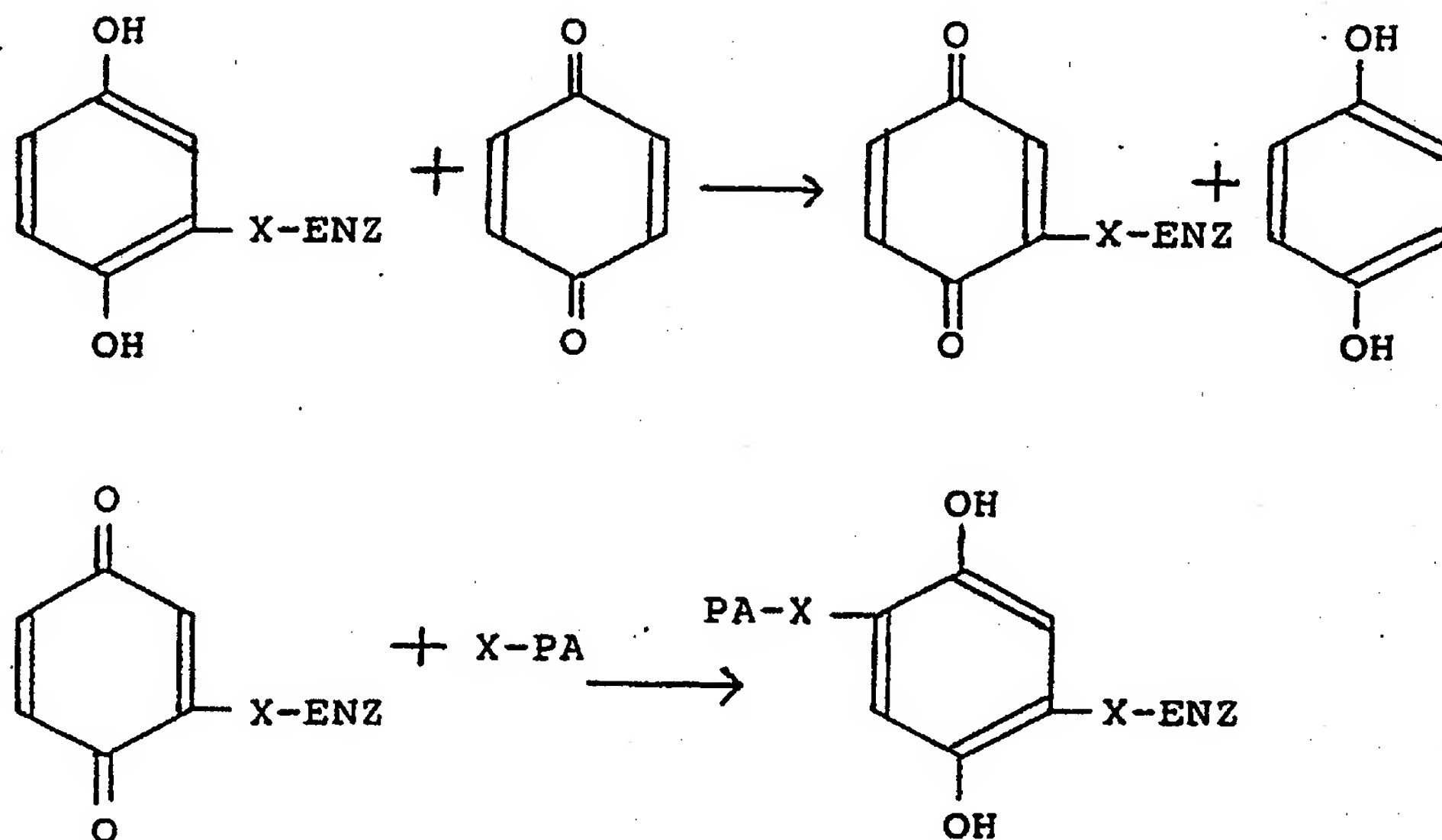
図8は図7における色の違いを示す図である。

発明を実施するための最良の形態

代表的な実施方法を概説すると次の通りである。

ベンゾキノンを用いる酵素とポリアミンの結合を例にとると、反応は、下記反応式に従って進行すると考えられている。





[上式中、ENZは酵素からアミノ基を除いた残基、PAはポリアミンからアミノ基を除いた残基、Xは第1級または第2級アミノ基である]

この反応は、例えば次のように行なわれる。透析のような手段で精製した酵素(約150部)にベンゾキノン(約1部)を加え、好ましくは僅かに加温して反応させるとワイン赤色の反応液となる。これをゲル濾過等の方法でクロマトグラフィー的に分離すると紫色、黄色およびワイン赤色のフラクションに分かれる。ワイン赤色のフラクションをとり、弱塩基の存在下にポリアミン(酵素の数分の1量)を僅かな加温下に反応させ、適宜精製すると酵素標識したポリアミンが得られる。

核酸の検出は、例えば次のようにして行うことができる。

(イ)核酸試料をメンブランにドットスポットするか、またはアガロースゲル電気泳動後メンブランにエレクトロトランスファーし、ベーキングして固定する。緩衝液に入れたうし血清アルブミンで処理後、標識または前駆体を結合したポリアミンを加えて反応させる。洗浄後、標識前駆体の場

合は標識に変換し、検索する。

(ロ)DNAフラグメントをアガロースゲル電気泳動に付し、サザンブロットィングする。放射能標識したプローブを用いて、加温下にプレハイブリダイゼーション後、ハイブリダイゼーションを行なう。洗浄後、X線フィルムでDNAの位置を調べる。その後、標識または前駆体を結合したポリアミンを反応させ、適宜発色させて検索する。

(ハ)DNAフラグメントをドットブロットィングによるかまたはアガロースゲル電気泳動後のサザンブロットィングによりメンブランに固定し、プレハイブリダイゼーション後Bio-DNAプローブを用いてハイブリダイゼーションを行なう。洗浄、ブロック後、酵素標識したストレプトアビジンを反応させ、洗浄、ブレインキュベーション後さらに別の酵素で標識したポリアミンを反応させる。洗浄後、それぞれの酵素の発色処理に付すると、2色の発色により、ハイブリダイズしたDNAとハイブリダイズしないDNAが異なる色に発色した像が得られる。例えば、アルカリホスファターゼ/BCIP-NBT系は紫、ペルオキシダーゼ/DAB系は褐色に発色する。この方法において、プローブとポリアミンの処理順序は逆に行うこともできる。

上記のようにして発色処理したものは、X線フィルムとしてではなくメンブランそのものが発色しているので、直接メンブラン上に核酸を確認することができる。また、PCRの場合、同程度の分子量をもつが配列が異なる増幅物を、ハイブリダイゼーションにより区別することができる。

この発明の方法は、危険な試薬を用いる必要がなく、高感度(例えば、DNAは数ピコグラム、RNAは数十ピコグラム)であり、しかも、操作が容易であるという利点を有する。なお、この発明の実施に必要な試薬類をキットにしておくと、操作がさらに容易となる。

実施例

以下、実施例によりこの発明の具体的実施態様を説明する。

実施例 1

(ペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ標識ポリエチレンイミンの製造)

アルカリホスファターゼ(CIP、ベーリンガー・マイハイム社、グレードI)0.81ml/4.05mg/7500単位または西洋わさびペルオキシダーゼ(ベーリンガー・マンハイム社製)を、40℃で一夜、0.1Mりん酸緩衝液で透析し、イムノケミストリー(Immuno Chemistry)14巻767-774頁(1977年)記載の方法にしたがって、p-ベンゾキノン(120μl/30mg/エタノール)と遮光下37℃で60分間反応させ、セファデックスG-25でゲル濾過後、ワイン赤色のフラクション(2.7ml)を分取した。これに300μlの1M-NaHCO₃(pH9.0)、30μlのポリエチレンイミン(エポミン)を加え、よく混合した。これを37℃で遮光下に一夜反応させた後、5mMりん酸緩衝液(pH6.8)で透析して酵素・ポリエチレンイミン・コンジュゲートを得た。本品は4℃で1年以上安定であった。

(メンブラン上の核酸のブロッティング)

「モレキュラー・クローニング」("Molecular Cloning", 1982年、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー)記載の方法に従って、ナイロンメンブラン(ポール社製Biodyne A)上に変性したλHind III DNAまたはエシエリキア・コリ(E. coli)K-12 rRNAをドットブロッティングした。また、ベクター pBR322のHind III 部位にランダムクローニングしたスタフィロコッカス・アウレウス(St. aureus)ゲノムDNAのクローンを、定法により増幅、抽出した後、Hind III

Iで処理した。試料を1%アガロースゲル電気泳動で分離後、メンブラン上にエレクトロブロッティングした。(40V, 4時間)。同様に、 λ Hind III DNAもブロッティングした。これらのDNAまたはRNA試料はベーキング(80℃、2時間)することにより、メンブラン上に固定した。

(メンブラン上にプロットした核酸の検出)

固定されたDNAまたはRNAを含むメンブランを5mMりん酸緩衝液-1%うし血清アルブミン(BSA、シグマ社、フラクションV)に浸し、室温で60分間インキュベートした。次に、アルカリホスファターゼ(またはペルオキシダーゼ)標識ポリエチレンイミンを100 μ l/20mlの割合で加え、37℃で120分間インキュベートした。メンブランを5mMりん酸緩衝液-1%BSA-0.1%ツイーン20で10分間ずつ3回洗浄し、0.1MトリスHCl(pH 9.5)-10mM-MgCl₂でリンスした。ブロモクロロインドリルホスフェート(BCIP)75mg/ml 0.1MトリスHCl (pH 9.5)-10mM-MgCl₂ 20mlおよびニトロブルーテトラゾリウム(NBT)50mg/ml各300 μ l/50mlを加えた発色液中でメンブランを発色させた。

(サザン・プロット・ハイブリダイゼーション)

スタフィロコッカス・アウレウス(*St. aureus*)ゲノムkbpフラグメントDNAを使用し、常法に従って³²P-dCTPまたはBio-11-dUTP(BRL)を用いてニックトランスレーション反応を実施し、³²P-DNAまたはBio-DNAを調製した。変性したプローブを含むハイブリダイゼーション緩衝液(5×SSC、0.1%BSA、0.1%ツイーン20)により、メンブランを42-55℃で一夜ハイブリダイゼーション処理した。その後、55℃で30分間、0.16×SSC-0.1%ツイーン20で洗

浄した(時点A)。

^{32}P -DNAプローブを用いた場合は、時点Aでメンブランを湿ったままサランラップに包み、X線フィルムに露出してシグナルを検出した。その後、メンブランを 42°C で3時間以上にわたり3%BSA-0.1%ツイーン20-りん酸緩衝食塩水(PBS)でブロッキング処理し、ペルオキシダーゼ標識ポリエチレンジアミンを $100\mu\text{l}$ /シートの割で0.1%BSA-0.1%ツイーン-PBSに加え、2-3時間反応させた。ついで、0.1%ツイーン20-PBSで20分間ずつ3回洗浄し、ジアミノベンジジン(DAB)- H_2O_2 系で発色させた。

Bio-DNAプローブを用いた場合は、時点A後、PBS-0.5%ツイーン20を用いて室温で60分間処理した。ついで、アルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジンを含むPBS-0.05%ツイーン20により室温で20分間処理後、PBS-0.5%ツイーン20で10分間ずつ2回洗浄した。次に、PBS-1%BSA-0.1%BSA-0.1%ツイーン20を用い室温で20分間ブレインキューベーション後ペルオキシダーゼ標識ポリエチレンジアミンを加え、 42°C で3時間反応させた。メンブランをPBS-0.1%ツイーン20で10分間ずつ3回洗浄後、0.1MトリスHCl (pH 9.5) - 10mM-MgCl₂でリンスし、BCIP-NBT系を用いて室温で20分間発色処理した。PBSで10分間ずつ3回洗浄後、さらにDAB- H_2O_2 系で発色処理した。メンブランをPBS-0.1%ツイーン20で洗浄後保存した。

(結果)

(イ) λ DNAまたはエシエリキア・コリ(E. coli)rRNAをドットスポットし、アルカリホスファターゼ標識ポリエチレンジアミンで検出した結果をそれぞれ図1および図2に示す。スポット量は、図1の上から λ DN

A①4.7 μ g、②470ng、③47ng、④4.7ng、⑤470pg、⑥47pg、⑦4.7pg、⑧470fg、図2の上から γ RNA①5 μ g、②500ng、③50ng、④5ng、⑤500pg、⑥50pgである。DNAでは470fg、RNAでは50pgの感度で検出できた。

(ロ) λ Hind III DNAの希釈系列を作り、その各試料をアガロースゲル電気泳動で分り後、ゲルからメンブランへエレクトロブロッティングしたものを、アルカリホスファターゼ標識ポリエチレンジオキサンで検出した結果を図3に示す。ここでは、希釈系列(0.06 μ g)の試料においても、ゲル分り後のエチジウムブロミド染色パターンと、ブロッティングの検出パターンは完全に一致していた。これによりこの発明の方法の正しさが裏づけられた。

(ハ) λ Hind III DNAのサイズマーカーを含むpBR322に挿入されたDNA断片を、制限酵素で切り出した後、アガロースゲル電気泳動で分りし、メンブラン上にエレクトロブロッティングし、 32 P-DNAプローブでハイブリダイズして、そのハイブリッドをX線フィルムに露出して、シグナル(図5)を得た。このハイブリダイズしたDNAの種類を特定するために、そのメンブランをペルオキシダーゼ標識ポリエチレンジオキサン処理し、すべてのブロッティングされたDNAの位置(図4)を確認した。

(ニ) 上記(ハ)と同様に行なったものを、Bio-DNAプローブを用いた系でハイブリダイズすることにより、ハイブリダイズしたDNAとハイブリダイズしなかったDNAを同時に検出した。ここでは、Bio-プローブとアルカリホスファターゼストレプトアビジン、ペルオキシダーゼ標識ポリエチレンジオキサンのそれぞれ酵素を使い分けることにより、ハイブリダイズしたDNAと非ハイブリダイズDNAを2重染色することにより区別

することができた。結果を図 7 に示す。また、色の違いを図 8 に示す。図中、斜線部は褐色（ペルオキシダーゼ標識ポリエチレンイミン系）、黒色部は紫色（アルカリホスファターゼ／ストレプトアビジン系）を示す。そのパターンは、同様に行なってエチジウムブロミド染色した結果（図 6）と一致していた。

請 求 の 範 囲

1. 核酸を付着または含有している疑のある固形担体に、測定可能なシグナルを発生し得る標識またはその前駆体を結合させたポリアミンを接触させて、核酸とポリアミンとの間で複合体を形成させ、前駆体を用いた場合は標識に変換し、その前または後に複合体を形成していないポリアミンを除去し、その後、標識を検索することを特徴とする、核酸の検出法。
2. 測定可能なシグナルを発生し得る標識またはその前駆体が酵素である、請求項1記載の核酸の検出法。
3. 酵素が、アルカリホスファターゼまたはペルオキシダーゼである、請求項2記載の核酸の検出法。
4. 酵素が架橋試薬を介してポリアミンに結合している、請求項2または3記載の核酸の検出法。
5. 架橋試薬がベンゾキノンである、請求項4記載の核酸の検出法。
6. ポリアミンが、炭素原子数3～50の脂肪族鎖であり、鎖の両端に第1級アミノ基があり、鎖はイミノ基で中断されることがあり得る、天然ポリアミンまたは合成ポリアミンである、請求項1または4記載の核酸の検出法。
7. ポリアミンが、炭素原子数6～15の脂肪族鎖である、請求項6記載核酸の検出法。
8. ポリアミンが、合成ポリアミンである、請求項7記載の核酸の検出法。
9. 合成ポリアミンが、ポリエチレンジアミンである、請求項8記載の核酸の検出法。
10. 標的核酸を付着または含有している疑のある固形担体に、
(イ)測定可能なシグナルを発生し得る標識またはその前駆体を結合させ

た標的核酸にハイブリダイズし得るプローブをハイブリダイゼーション条件下で接触させて、ハイブリッドを形成させ、前駆体を用いた場合は標識に変換し、その前または後にハイブリッドを形成していないプローブを除去し、その後、標識を検索することを含む第1の検出操作、および

(ロ)測定可能なシグナルを発生し得る別の標識またはその前駆体を結合させたポリアミンを接触させて、核酸とポリアミンとの間で複合体を形成させ、前駆体を用いた場合は標識に変換し、その前または後に複合体を形成していないポリアミンを除去し、その後、標識を検索することを含む第2の検出操作、

を組合わせて任意の順序で実施することを特徴とする、標的核酸とそれ以外の核酸の識別検出法。

11. 第1の検出操作がサザン・ブロット・ハイブリダイゼーション法により行われる、請求項10記載の核酸の検出法。

12. 測定可能なシグナルを発生し得る標識またはその前駆体が酵素である、請求項10記載の核酸の検出法。

13. 酵素が、アルカリホスファターゼまたはペルオキシダーゼである、請求項12記載の核酸の検出法。

14. 酵素が架橋試薬を介してポリアミンに結合している、請求項12または13記載の核酸の検出法。

15. 架橋試薬がベンゾキノンである、請求項14記載の核酸の検出法。

16. ポリアミンが、炭素原子数3～50の脂肪族鎖であり、鎖の両端に第1級アミノ基があり、鎖はイミノ基で中断されることがあり得る、天然ポリアミンまたは合成ポリアミンである、請求項10または14記載の核酸の検出法。

17. ポリアミンが、炭素原子数6～15の脂肪族鎖である、請求項16

記載核酸の検出法。

18. ポリアミンが、合成ポリアミンである、請求項17記載の核酸の検出法。

19. 合成ポリアミンが、ポリエチレンジアミンである、請求項18記載の核酸の検出法。

20.

(イ)酵素で標識したポリアミン、および

(ロ)酵素作用によりシグナルを発生する色原体を含む、核酸検出用キット。

21. 酵素が、アルカリホスファターゼまたはペルオキシダーゼである、請求項20記載の核酸の検出法。

22. 酵素が架橋試薬を介してポリアミンに結合している、請求項20または21記載の核酸の検出法。

23. 架橋試薬がベンゾキノンである、請求項22記載の核酸の検出法。

24. ポリアミンが、炭素原子数3～50の脂肪族鎖であり、鎖の両端に第1級アミノ基があり、鎖はイミノ基で中断されることがあり得る、天然ポリアミンまたは合成ポリアミンである、請求項20または22記載の核酸の検出法。

25. ポリアミンが、炭素原子数6～15の脂肪族鎖である、請求項24記載核酸の検出法。

26. ポリアミンが、合成ポリアミンである、請求項25記載の核酸の検出法。

27. 合成ポリアミンが、ポリエチレンジアミンである、請求項26記載の核酸の検出法。

Fig. 1

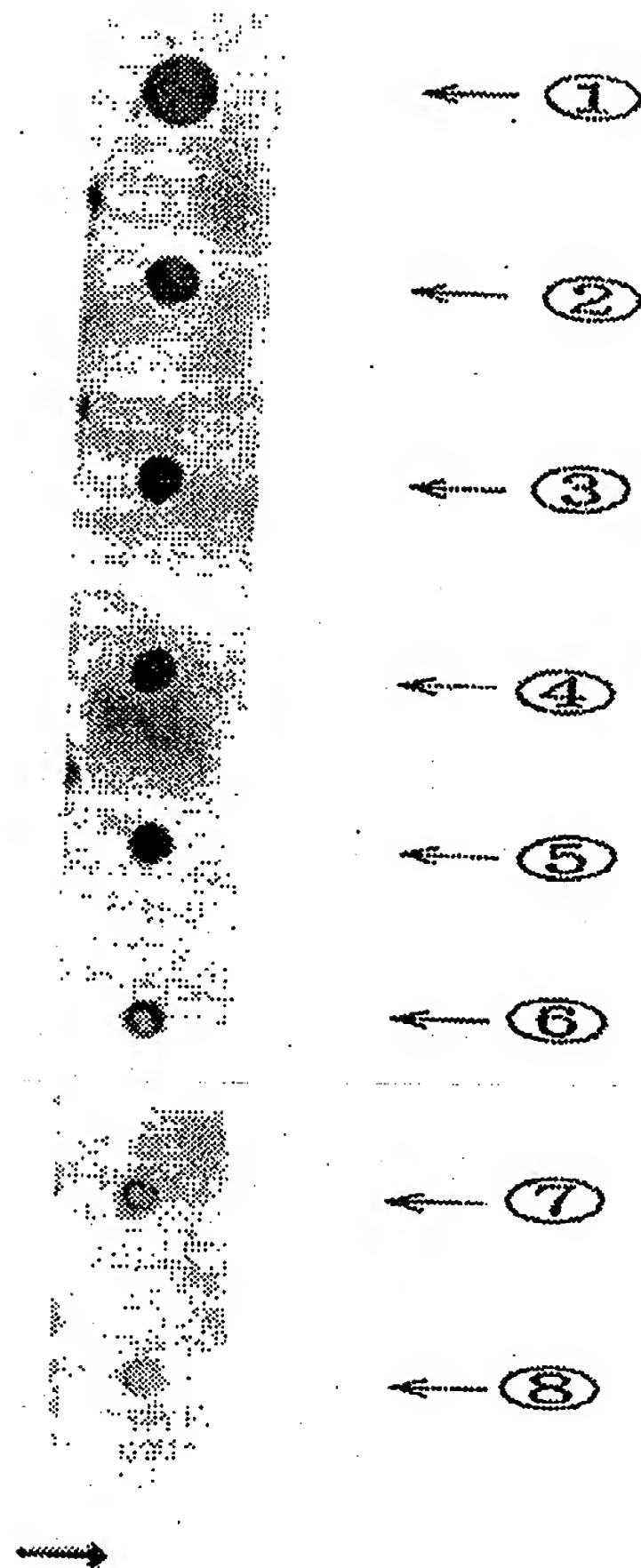


Fig. 2

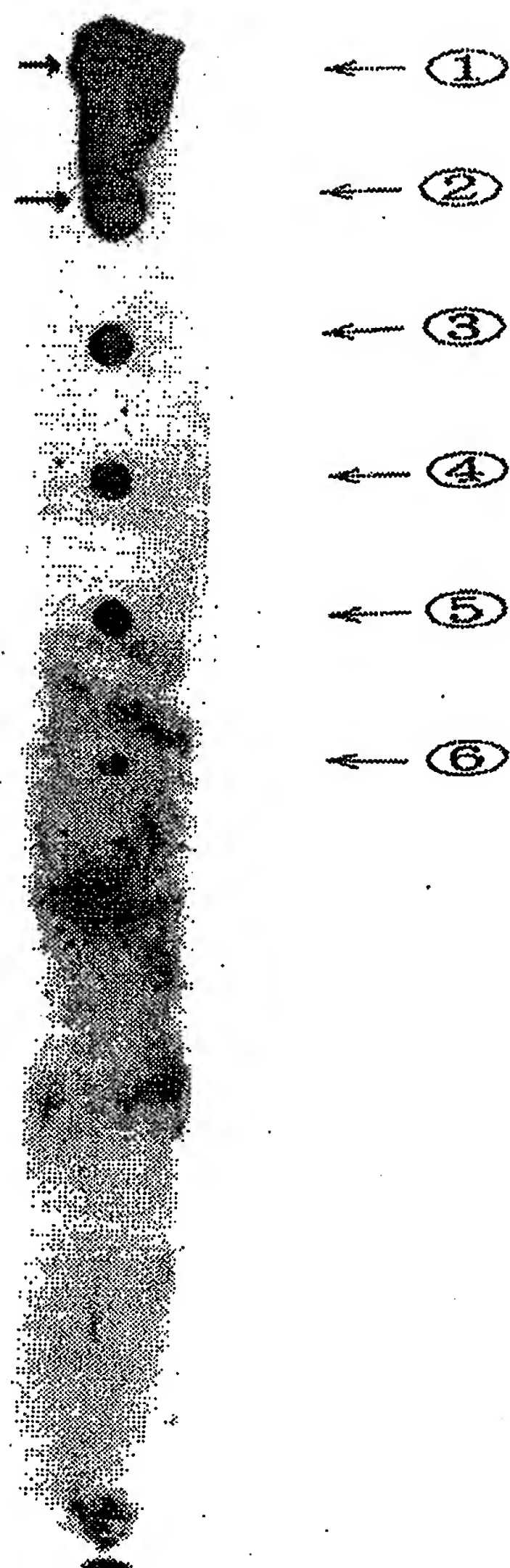


Fig. 3

2 μ g 1 μ g 0.5 μ g 0.25 μ g 0.125 μ g 0.06 μ g
 ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓

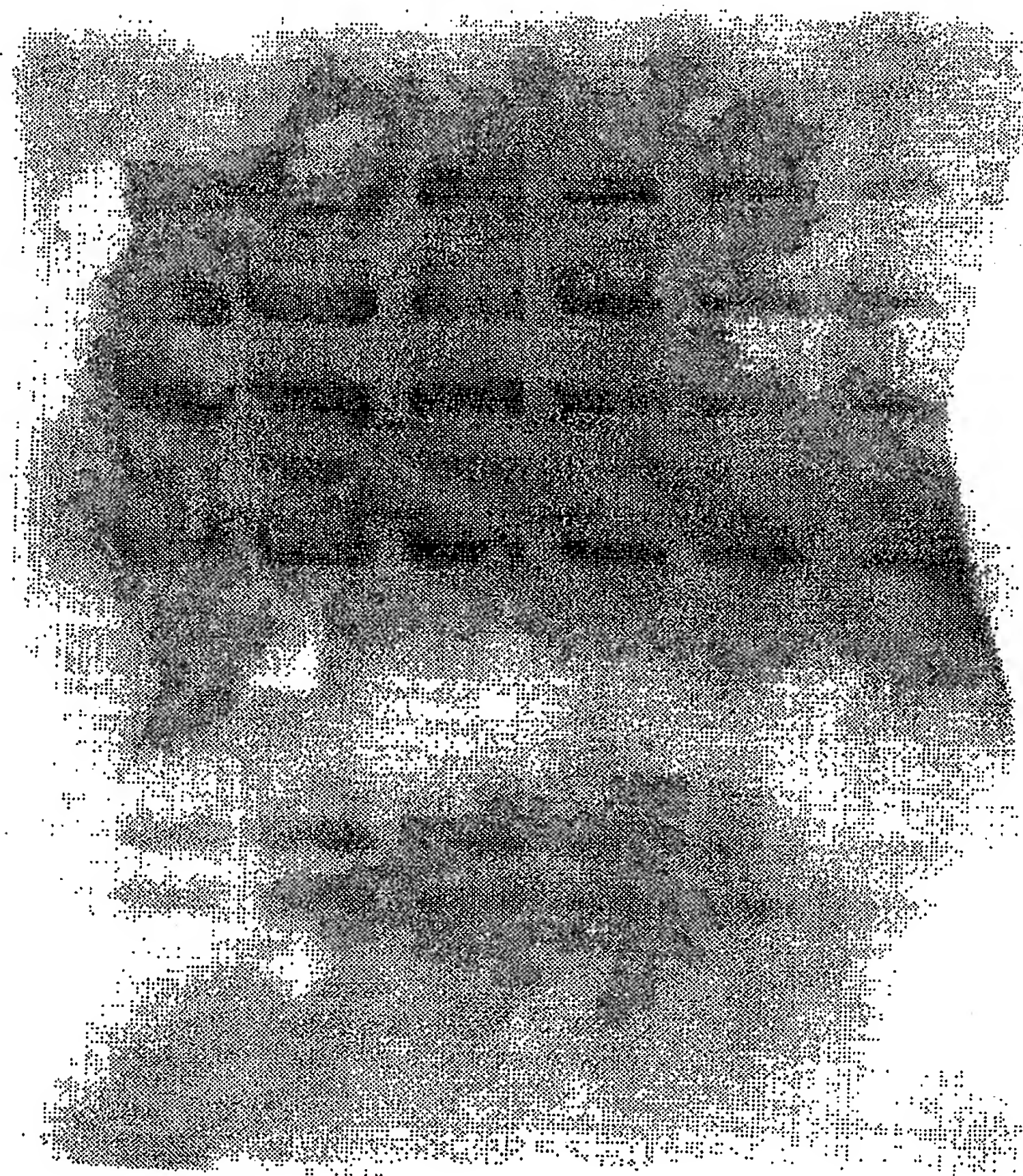
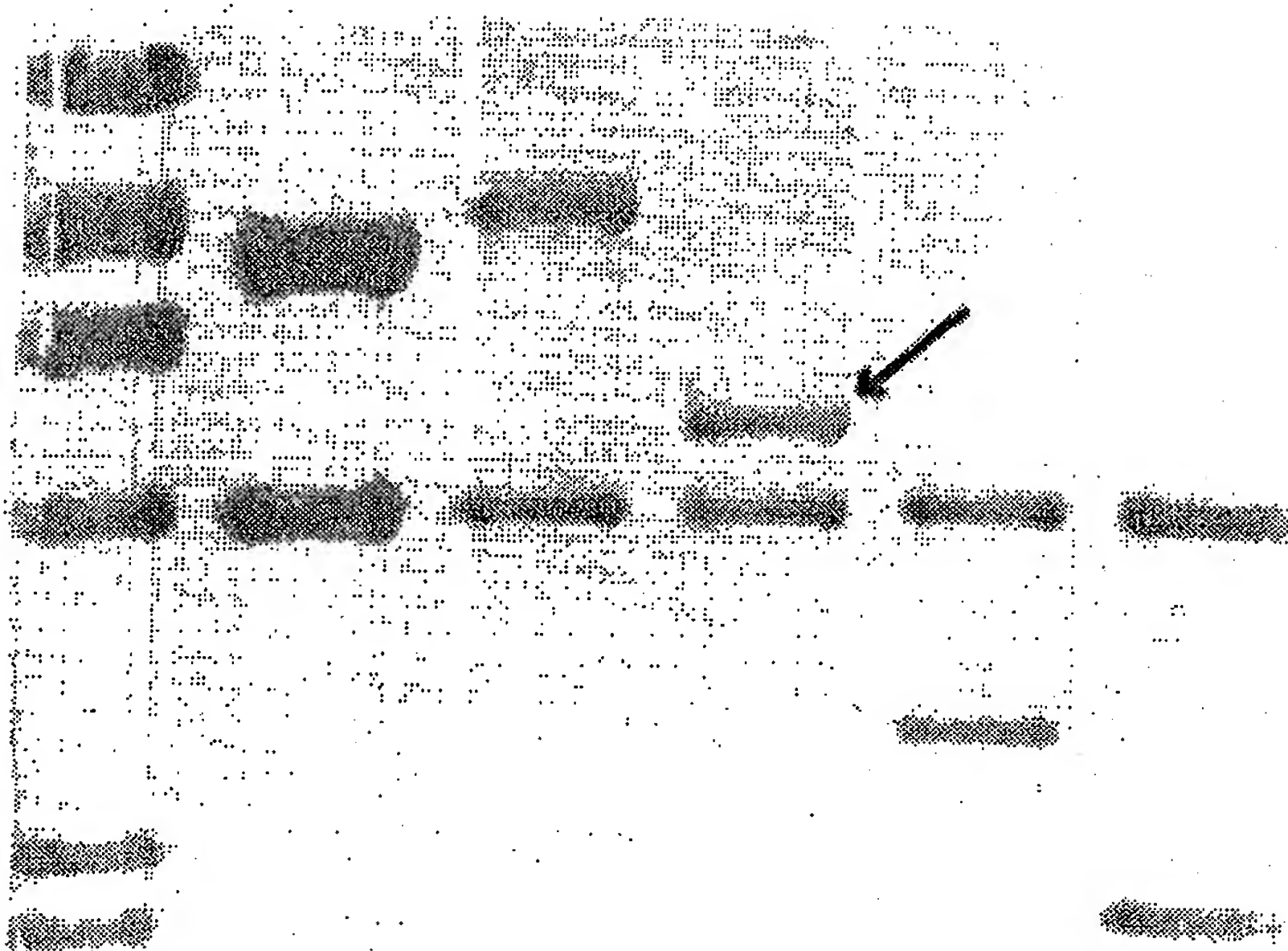


Fig. 4

λ Hind III マーカー



PBR
322

Fig. 5



Fig. 6

λ Hind III マーカー



←
PBR
322

Fig. 7

λ Hind III マーカー

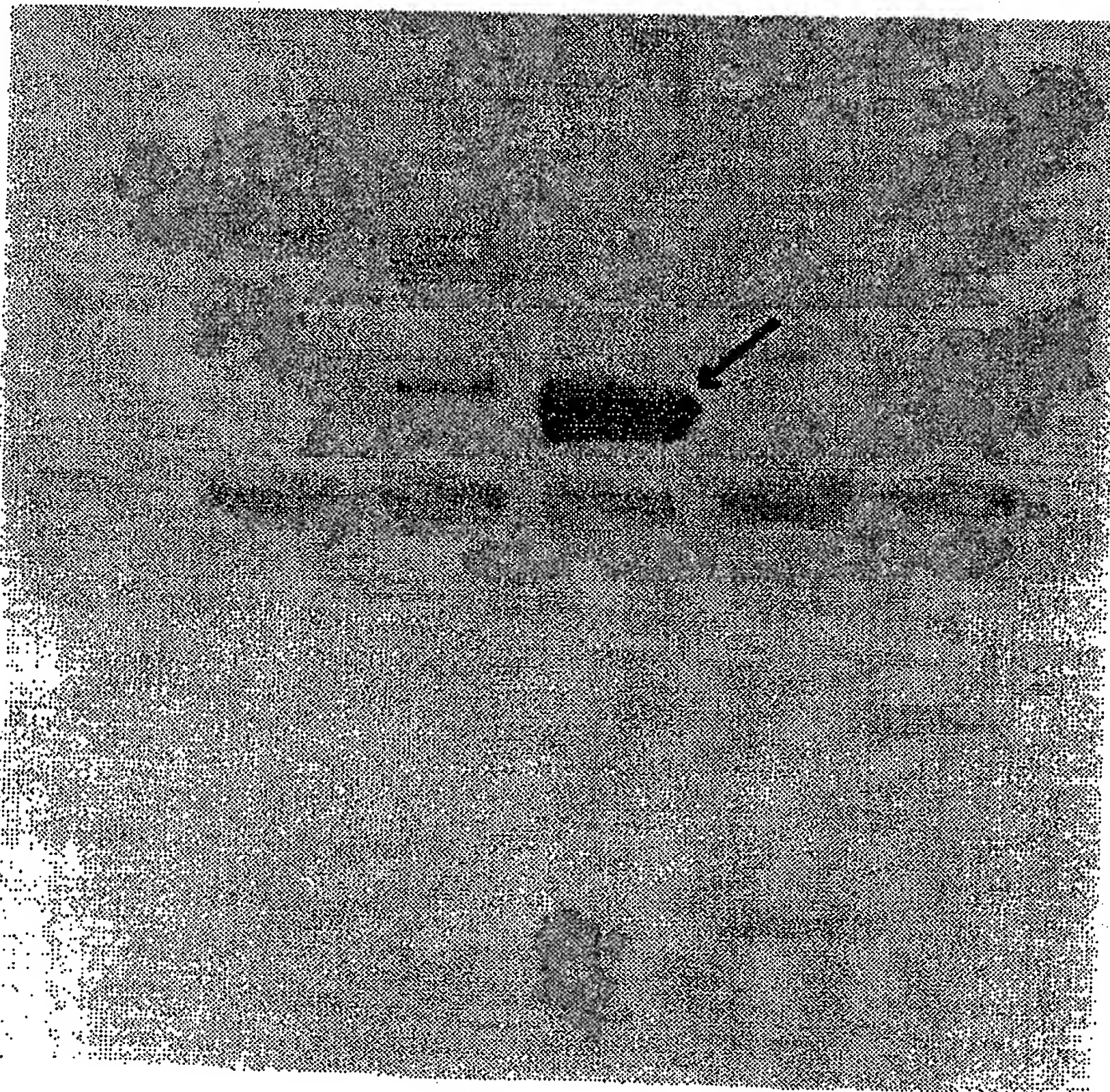
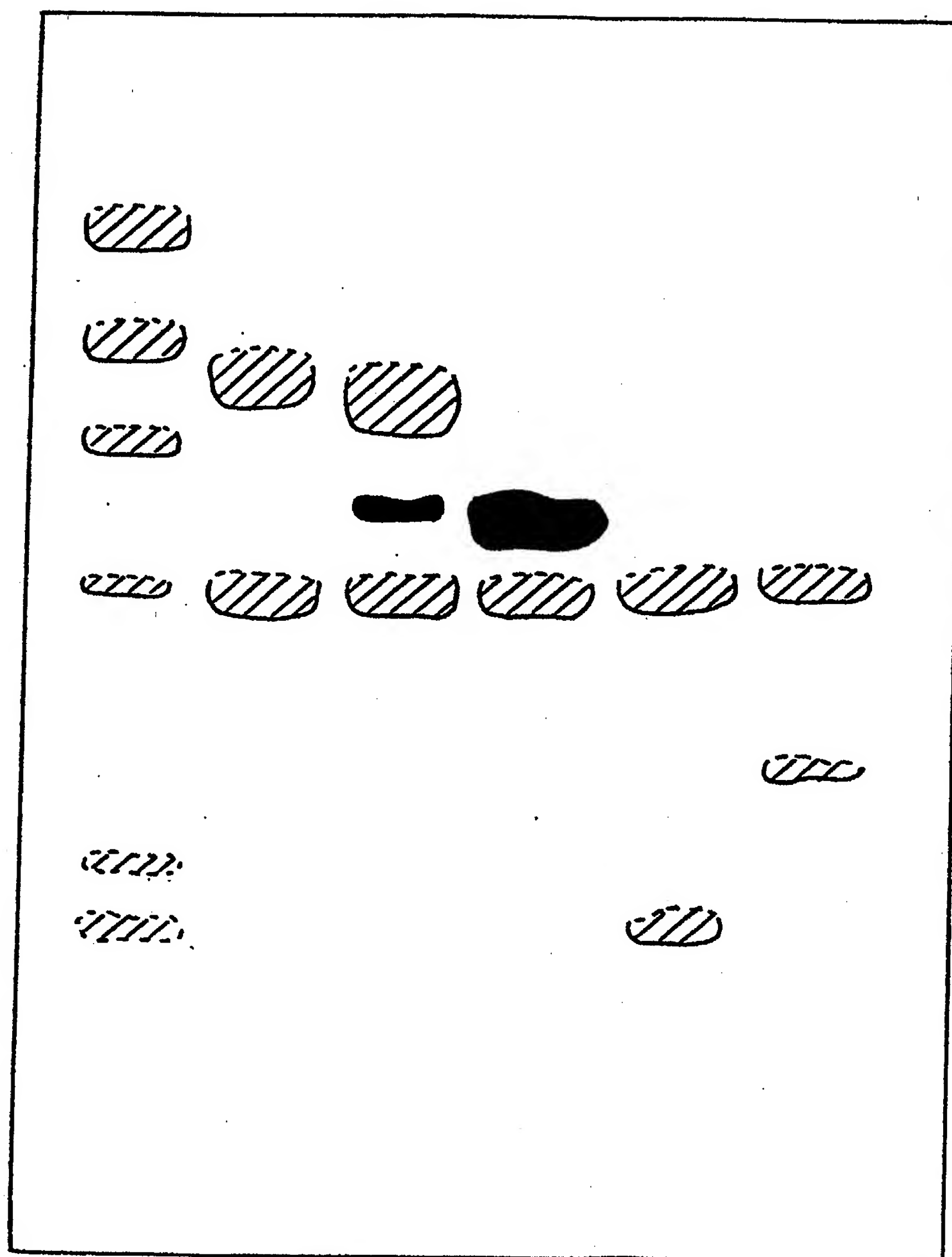


Fig. 8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP93/01124

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁵ C12Q1/68, 1/28, 1/42

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁵ C12Q1/68, 1/28, 1/42

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, CAS, BIOSIS PRE VIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, A, 1-124400 (Europaisches Laboratorium fur Molekularbiologie (EMBL)), May 17, 1989 (17. 05. 89), & EP, B, 120376 & US, 5053326 & DE, A, 3310337	1-27
A	JP, A, 54-143297 (Institute Pasteur), November 8, 1979 (08. 11. 79), & FR, A, 2422956 & DE, A, 2915082 & US, 4581333 & BE, A, 875598 & NL, A, 7902911	1-27

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

November 1, 1993 (01. 11. 93)

Date of mailing of the international search report

November 22, 1993 (22. 11. 93)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12Q1/68, 1/28, 1/42

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12Q1/68, 1/28, 1/42

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, WPI/L, CAS, BIOSIS PRE VIEWS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, A, 1-124400 (オイロペーイシエス・ラボラ トリウム・デュール・モレクラー ルビオロジー), 17. 5月. 1989 (17. 05. 89) &EP, B, 120376 &US, 5053326 &DE, A, 3310337	1-27
A	JP, A, 54-143297 (インステイチユート・パスツール), 8. 11月. 1979 (08. 11. 79) &FR, A, 2422956 &DE, A, 2915082	1-27

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日
若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献
(理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日
の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と
矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため
に引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規
性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文
献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性
がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01. 11. 93

国際調査報告の発送日

22. 11. 93

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

4 B 8 1 1 4

電話番号 03-3581-1101 内線

3449

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	<p>&US. 4581333&BE, A. 875598 &NL, A. 7902911</p>	